

**Formulation for activating NK-cell activity for modulating immunofunction with respect to cancer, for reducing blood cholesterol level and obesity, contains chitin and chitosan derived from beta-type chitin of squid bone**

**Patent Assignee: GOTO CORP YG; KAIZU N**

**Inventors: GOTO Y; KAIZU N**

Patent Family (1 patent, 1 country)							
Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Update	Type
JP 2003146887	A	20030521	JP 2001341941	A	20011107	200377	B

**Priority Application Number (Number Kind Date): JP 2001341941 A 20011107**

Patent Details					
Patent Number	Kind	Language	Pages	Drawings	Filing Notes
JP 2003146887	A	JA	5	0	

**Alerting Abstract: JP A**

**NOVELTY** - A formulation for activating NK-cell activity contains chitin and chitosan derived from beta-type chitin of squid bone.

**DESCRIPTION** - An INDEPENDENT CLAIM is also included for food/beverage products having NK-cell activation effect, containing chitin and chitosan manufactured from beta-type chitin derived from squid bone.

**ACTIVITY** - Immunomodulator; Cytostatic; Anorectic; Antilipemic.

**MECHANISM OF ACTION** - NK-cell-Activator; Cholesterol-Antagonist. Male Wistar mice (18-22 order SPF grade) were administered with fodder containing wheat flour, maize powder, soybean powder, wheat bran, fishmeal, bone meal, yeast, salt, vegetable oil, cod liver oil, multimineral, and multivitamin. The animals were divided into 3 groups. One group was administered with chitin and chitosan derived from crab, group 2 was administered with chitin derived from dietary fiber, group 3 was administered with chitin derived from squid bone, respectively. The animals were fed for 3 weeks and killed. The spleen was removed from the animal and immersed in cold Hank balanced salt solution. The spleen tissue was removed, cleaned and homogenated and nucleated cell was created. The NK-cell cytotoxicity with respect to YAC-1 tumor cell was measured by MTT staining. The stained cells were cultivated in 96 well plates and percentage of cytotoxicity was measured. The result showed that the group administered with fodder and chitin derived from squid bone had NK-cell activity of 53.0+/-8.64%.

**USE** - For modulating immunofunction with respect to cancer, for reducing increase in blood cholesterol level and obesity.

**ADVANTAGE** - The NK-cell is effectively activated and immunofunction is modulated with respect to cancer.

#### International Patent Classification

IPC	Level	Value	Position	Status	Version
A23L-0001/30	A	I	F	R	20060101
A61K-0031/722	A	I	L	R	20060101
A61K-0035/56	A	I	L	R	20060101
A61P-0003/04	A	I	L	R	20060101
A61P-0003/06	A	I	L	R	20060101
A61P-0035/00	A	I	L	R	20060101
A61P-0037/04	A	I	L	R	20060101
A61P-0043/00	A	I	L	R	20060101
C08B-0037/08	A	I	L	R	20060101
A23L-0001/30	C	I	F	R	20060101
A61K-0031/716	C	I	L	R	20060101
A61K-0035/56	C	I	L	R	20060101
A61P-0003/00	C	I	L	R	20060101

A61P-0035/00	C	I	L	R	20060101
A61P-0037/00	C	I	L	R	20060101
A61P-0043/00	C	I	L	R	20060101
C08B-0037/00	C	I	L	R	20060101

# Original Publication Data by Authority

## Japan

Publication Number: JP 2003146887 A (Update 200377 B)

Publication Date: 20030521

**\*\*FORMULATION AND FOOD AND DRINK HAVING NK CELL- ACTIVATING EFFECT\*\***

Assignee: GOTOO CORPORATION, KK (GOTO-N) KAIZU NOBUHIDE (KAIZ-I)

Inventor: GOTO YOSHIO KAIZU NOBUHIDE

Language: JA (5 pages, 0 drawings)

Application: JP 2001341941 A 20011107 (Local application)

Original IPC: A61K-31/722(A) A23L-1/30(B) A61K-35/56(B) A61P-3/04(B) A61P-3/06(B) A61P-35/00(B) A61P-37/04(B) A61P-43/00(B) C08B-37/08(B)

Current IPC: A23L-1/30(R,A,I,M,JP,20060101,20051220,A,F) A23L-1/30(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,F) A61K-31/716(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61K-31/722(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) A61K-35/56(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) A61K-35/56(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61P-3/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61P-3/04(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) A61P-3/06(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) A61P-35/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) A61P-35/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61P-37/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61P-37/04(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) A61P-43/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) A61P-43/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) C08B-37/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) C08B-37/08(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L)

Current JP FI-Terms: A23L-1/30 A A61K-31/722 A61K-35/56 A61P-3/04 A61P-3/06 A61P-35/00 A61P-37/04 A61P-43/00 107 C08B-37/08 A  
 Current JP F-Terms: 4B018 4C086 4C087 4C090 4C201 4C206 4C086AA01 4C087AA01 4C086AA02 4C087AA02 4C090AA09 4C090BA46 4C090BA47 4C090BA91 4C087BB15 4C090BC28 4C087CA14 4C090DA09 4C090DA23 4C090DA27 4C086EA23 4C086MA01 4C086MA04 4B018MD41 4B018ME02 4B018ME04 4B018ME08 4C086NA14 4C087NA14 4C086ZA70 4C087ZA70 4C086ZB09 4C087ZB09 4C086ZB22 4C087ZB22 4C086ZB26 4C087ZB26 4C086ZC33 4C087ZC33

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-146887

(P2003-146887A)

(43)公開日 平成15年5月21日(2003.5.21)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード(参考)
A 6 1 K 31/722		A 6 1 K 31/722	4 B 0 1 8
A 2 3 L 1/30		A 2 3 L 1/30	A 4 C 0 8 6
A 6 1 K 35/56		A 6 1 K 35/56	4 C 0 8 7
A 6 1 P 3/04		A 6 1 P 3/04	4 C 0 9 0
	3/06	3/06	
審査請求 有 請求項の数 2 O L (全 5 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2001-341941(P2001-341941)

(22)出願日 平成13年11月7日(2001.11.7)

(71)出願人 397067255

有限会社ゴトーコーポレーション

静岡県清水市南矢部765番地の1

(71)出願人 599045408

海津 暢秀

東京都世田谷区赤堤2-10-17

(72)発明者 後藤 芳夫

静岡県清水市南矢部765番地の1 有限会

社ゴトーコーポレーション内

(74)代理人 100082669

弁理士 福田 賢三 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 NK細胞活性化作用を有する製剤および飲食品

(57)【要約】

【課題】 NK細胞を活性化することにより免疫機能を増強してがんの進行の抑制及び予防、並びにその他の病原体に対する抵抗性を向上することができ、さらに血中コレステロール上昇抑制、肥満防止などの作用をも期待できるNK細胞活性化作用を有する製剤および飲食品を提供する。

【解決手段】 本発明のNK細胞活性化作用を有する製剤および飲食品は、イカ骨由来のβ型キチン質から製造されるキチン・キトサンを有効成分として含有してなる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 イカ骨由来の $\beta$ 型キチン質から製造されるキチン・キトサンを有効成分として含有してなるNK細胞活性化作用を有する製剤。

【請求項2】 イカ骨由来の $\beta$ 型キチン質から製造されるキチン・キトサンを含有してなるNK細胞活性化作用を有する飲食品。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、NK細胞を活性化することにより免疫機能を増強してがんの進行の抑制及び予防、並びにその他の病原体に対する抵抗性を向上することができ、さらに血中コレステロール上昇抑制、肥満防止などの作用をも期待できるNK細胞活性化作用を有する製剤および飲食品に関する。

## 【0002】

【従来の技術】一般に呼ばれているキチン・キトサンとは、カニ・エビなどの殻の構成物質である $\alpha$ 型キチン質をアルカリ処理（脱アセチル化）することにより、体内で吸収しやすい成分にしたものであり、分子量が数1,000から数100万を有するD-グルカンが $\beta$ -1,4結合で重合した天然のアミノ多糖の総称であり、その作用並びに用途について多くの研究、報告がなされている。尚、自然界にはキチンの方の存在量の方が多いが、キチンをアルカリ処理するとアセチル基が取り除かれ、キトサンが得られる。しかし完全にアセチル基が除去されず、キチン・キトサンの混合物で得られるので、明確に区別しないでキチン・キトサンと並べて呼ばれる。このようなキチン・キトサンは、コレステロール低下作用を有する製剤、健康食品として、或いは人工皮膚（被覆材）、縫合糸、人工透析膜、人工じん帯、人工支柱等の医療材料として、或いは殺虫剤、土壌改良剤等の農業材料として、その他にも化粧品、繊維関係分野などの広範な分野での適用が検討、一部実施されている。

【0003】しかし、一般に研究されているキチン・キトサンとしては、エビ・カニ由来の $\alpha$ 型キチン質を原料としたキチン・キトサンが用いられており、その際、イカ骨由来の $\beta$ 型キチン質を原料としたキチン・キトサンも同一視しているために研究の立ち後れがみられる。即ちイカ骨由来の $\beta$ 型キチン質を原料とするキチン・キトサンはそれ自身公知であるが、キチン・キトサン研究会編「最後のバイオマスキチン、キトサン 1988年刊」に詳細に記載されているようなカニ・エビ由来の $\alpha$ 型キチン質を原料としたキチン・キトサンの様に一般的ではないため、研究が遅れている。近年、イカ骨由来の $\beta$ 型キチン質から製造されるキチン・キトサンについても幾つかの研究、報告がなされ、特開平11-147828号公報には、イカ骨由来の $\beta$ 型キチン質から製造されるキチン・キトサンがカニ・エビ由来の $\alpha$ 型キチンから製造されるキチン・キトサンよりも血中コレステロール上昇

抑制作用が高く、肥満防止などの作用を期待できることが報告されている。また、最近ではイカ骨由来の $\beta$ 型キチン質を原料としたキチンがカニ・エビ由来の $\alpha$ 型キチン質を原料としたキチンよりも容易に脱アセチル化され易く、キトサン化し易く、しかも高分子体で高粘度の物性を有することから容易にフィルム化できるという報告（Shepherd, R.: NZBA. 1995(1995)）もなされている。或いは生体適合性も高いという報告もある。

【0004】一方、ナチュラルキラー（NK）細胞は、生体内で血液中の白血球が変化してできるといわれる免疫機能をつかさどるリンパ球の一種で、生体内に自然に備わったキラー細胞である。そして、このNK細胞は、体内でがん細胞や病原体などを攻撃して除去する機能を果たすため、このNK細胞の活性が高いほど免疫力が強くなり、がんの進行を抑制（抗がん作用）したり、がんを予防することが期待できることが知られている。したがって、NK細胞を活性化することは、がんの抑制及び予防、並びにその他の病原体に対する抵抗性を向上する目的において、直接的且つ有効な手段ということが出来る。因みにこのようなNK細胞活性化には、キャベツ発酵エキスをを用いた報告や米糠アラビノキシランを用いた報告がなされている。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明者は、まだ十分に研究されていないイカ骨由来の $\beta$ 型キチン質を原料としたキチン・キトサンが有する特性について鋭意研究の末、NK細胞活性化作用の増強効果においてカニ・エビ由来の $\alpha$ 型キチンから製造されるキチン・キトサンと著しい差異が認められたため、本発明を完成するに至った。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は上記に鑑み提案されたもので、イカ骨由来の $\beta$ 型キチン質から製造されるキチン・キトサンを有効成分として含有してなるNK細胞活性化作用を有する製剤および飲食品に関するものである。即ち本発明者らは、従来知られているキチン・キトサンのもつ免疫増強作用についてカニ殻由来の高分子キチン・キトサン（分子量50万以上）とイカ骨由来の高分子キチン・キトサン（分子量50万以上）とを比較することによってカニ殻由来のキチン・キトサンにはNK細胞活性化作用がないが、イカ骨由来のキチン・キトサンにはNK細胞活性化作用があることを見出した。この発見によってイカ骨由来のキチン・キトサンを経口的に摂取することによってNK細胞活性化を促進するという本発明を完成するに至った。尚、前述のように自然界、即ちイカ骨中にはキチンの存在量が多く、キチンを脱アセチル化してキトサンが得られるのであるが、完全にアセチル基が除去されずにキチン・キトサンの混合物で得られるので、これらに応じて本発明でも明確に区別しないでキチン・キトサンと並べて呼称する。

## 【0007】

【発明の実施の形態】本発明に用いるイカ骨由来の $\beta$ 型キチン質から製造されるキチン・キトサンは一部の製造業者にて既に市場に提供、販売されているので、これ入手、使用するのには全く問題がない。

【0008】本発明のNK細胞活性化作用を有する製剤、飲食品は、イカ骨由来の $\beta$ 型キチン質から製造されるキチン・キトサンを有効成分として含有し、NK細胞活性化作用を損なわない限り他の補助成分を含んでもよく、人体に無害なものであればどのような補助成分を添加、併用してもよい。

【0009】また、本発明のNK細胞活性化作用を有する製剤は、具体的に形態を特定するものではなくどのような形態でも良い。例えば打錠製剤とした錠剤としてもよいし、顆粒状とした顆粒剤としてもよく、或いはカプセル剤の内容物として粉末状又は液状で配合したものをゼラチンなどで皮包したカプセル剤としてもよい。同様に、本発明のNK細胞活性化作用を有する飲食品としても、具体的に形態を特定するものではなくどのような形態の飲食物中に粉末状又は液状で配合、混入させるようにしてもよい。

【0010】本発明のNK細胞活性化作用を有する製剤の投与量は、イカ骨由来の $\beta$ 型キチン質を原料とするキチン・キトサンとして通常、経口にて0.1～50g/60kg体重/日で有効である。尚、イカ骨由来の $\beta$ 型キチン質を原料とするキチン・キトサンは経口で実質的に無毒である。また、飲食品としての摂取目安として、後述する実施例では、実験動物に対する飼料中に10重量%のイカ骨由来のキチン・キトサンを配合したが、これらの結果等から考慮してイカ骨由来のキチン・キトサンを1

〔実験用飼料組成〕

配合原料	基礎配合	食物繊維群	カニキトサン群	イカキトサン群
小麦粉	20	20	20	20
トウモロコシ粉末	38	38	38	38
大豆粉末	20	20	20	20
小麦フスマ	10	10	10	10
魚粉	5	5	5	5
骨粉	1	1	1	1
酵母	1	1	1	1
食塩	1	1	1	1
植物油	2	2	2	2
タラ肝油	1	1	1	1
マルチミネラル	1	1	1	1
マルチビタミン	0.1	0.1	0.1	0.1
セルロース		10		
カニキトサン			10	
イカキトサン				10

【0013】〈実験方法〉各群の実験動物に3週間の間、各実験飼料と水を自由に摂取させた後、実験動物に苦痛を与えることなく屠殺し、脾臓を取り出して実験に供した。

～50重量%の範囲で用いることが望ましい。

【0011】また、本発明の製剤及び飲食品の有効成分であるイカ骨由来の $\beta$ 型キチン質を原料とするキチン・キトサンが、コレステロールの吸収を阻害し、胆汁酸及び脂質の吸収を阻害することにより、血中コレステロール上昇抑制を果たし、肥満を防止することについては、既に特開平11-147828号公報に詳細に示されている通りである。即ち本発明のNK細胞活性化作用を有する製剤および飲食品は、免疫機能を増強し、がんの抑制及び予防、並びにその他の病原体に対する抵抗性を向上する目的で投与（服用）、摂取する者に、血中コレステロール上昇抑制、肥満防止の作用も果たすことができる。

【0012】

【実施例】〈実験条件〉供試動物として、Wister系雄マウス（18～22前後SPFグレード）を7日間、固形飼料で予備飼育して実験環境に順化したものを各群10匹に群分けして使用した。尚、固形飼料であるから、固型製剤としても食品としてもみなせる。飼育環境は、温度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度40～70%RHの環境で飼育した。実験用飼料は、基礎飼料（基礎配合）と、該基礎配合に、それぞれ外割で10重量%のセルロース（食物繊維群）、カニ殻由来の $\alpha$ 型キチン質から製造されたキチン・キトサン（カニキトサン群）、イカ骨由来の $\beta$ 型キチン質から製造されたキチン・キトサン（イカキトサン群）をそれぞれ添加したものを調製し、これを用いた。各実験用飼料の組成を表1に示した。

【表1】

・脾臓細胞の分離

脾臓は、実験動物よりすばやく取り出し、冷HBSS（Hank balanced salt solution）に浸し、脾臓を裁断し脾臓組織を洗浄した。洗浄した脾臓組織をホモジュネートし

細胞組織をNytex Filterで濾過しNucleated cellの単細胞suspensionを作成した。作成した細胞はNK細胞Cytotoxicityの測定に使用した。

・NK細胞Cytotoxicityの測定

YAC-1腫瘍細胞に対するNK細胞Cytotoxicityの測定は、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl tetrazolium bromide(MTT)染色で測定した。2.5mM Hepes(N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N-(2-ethanesulfonyl)acid), 2mM L-glutamine, 50  $\mu$ g/mL gentamycin sulfate

【測定結果】

を含んだRPMI-1640の0.1mMにYAC-1腫瘍細胞を $1 \times 10^4$ 個に調整し、不活性化した胎児性牛血清で10%に調整し96-well plateで培養した。さらに、96-well plateの前に脾臓から調整した脾臓細胞を添加した。その96-well plateを5%CO<sub>2</sub>気流中37℃で20時間培養した。この培養した96-well plateをMTT染色しCytotoxicityの%を測定した。

【0014】測定結果を表2に示した。

【表2】

実験群	NK細胞Cytotoxicity(10%)
基礎飼料群	38.5 $\pm$ 3.71a
基礎飼料+10重量%食物繊維群	46.1 $\pm$ 3.99bc
基礎飼料+10重量%カニキトサン群	41.5 $\pm$ 7.68ab
基礎飼料+10重量%イカキトサン群	53.0 $\pm$ 8.64c

a,b,c,dは、各群の統計的有意差 (P<0.05) を表す。

【0015】表2より明らかなように、YAC-1腫瘍細胞に対するNK細胞活性化作用は、基礎飼料群との比較でイカ骨由来の $\beta$ 型キチン質から製造されたキチン・キトサンを配合した飼料群（イカキトサン群）が統計的有意な活性化作用が認められた。しかし、カニ殻由来の $\alpha$ 型キチン質から製造されたキチン・キトサンを配合した飼料群（カニキトサン群）では、従来免疫増強作用効果があるとの報告もあるものの、今回の実験では基礎飼料群と同程度のNK細胞活性化効果しか認められないばかりか、食物繊維を配合した飼料群（食物繊維群）との比較でも有意にNK細胞活性化効果が低値を示していた。したがって、カニ殻由来の $\alpha$ 型キチン質から製造されたキトサンにはNK細胞活性化作用が認められないがイカ骨由来の $\beta$ 型キチン質から製造されたキトサンには、高分子主体であっても経口的な摂取によってもNK細胞活性化作用を有することを発見するに至った。

【0016】

【発明の効果】以上説明したように、本発明のNK細胞活性化作用を有する製剤および飲食品は、イカ骨由来の $\beta$ 型キチン質から製造されるキチン・キトサンを有効成分として含有してなり、NK細胞を活性化することにより免疫機能を増強してがんの進行の抑制及び予防、並びにその他の病原体に対する抵抗性を向上することができる。また、イカ骨由来の $\beta$ 型キチン質から製造されるキチン・キトサンは、血中コレステロール上昇抑制、肥満防止などの作用を果たすことができる。即ち本発明のNK細胞活性化作用を有する製剤および飲食品は、免疫機能を増強し、がんの抑制及び予防、並びにその他の病原体に対する抵抗性を向上する目的で投与（服用）、摂取する者に、血中コレステロール上昇抑制、肥満防止の作用も果たすことができる。逆に血中コレステロール上昇抑制、肥満防止の目的で服用、摂取する者に、免疫機能を増強し、がんの抑制及び予防、並びにその他の病原体に対する抵抗性を向上する作用を果たすことができる。

フロントページの続き

(51)Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード(参考)
A 6 1 P 35/00		A 6 1 P 35/00	
37/04		37/04	
43/00	1 0 7	43/00	1 0 7
C 0 8 B 37/08		C 0 8 B 37/08	A

(72)発明者 海津 暢秀  
東京都世田谷区赤堤2-10-17

F ターム(参考) 4B018 MD41 ME02 ME04 ME08  
4C086 AA01 AA02 EA23 MA01 MA04  
NA14 ZA70 ZB09 ZB22 ZB26  
ZC33  
4C087 AA01 AA02 BB15 CA14 NA14  
ZA70 ZB09 ZB22 ZB26 ZC33  
4C090 AA09 BA46 BA47 BA91 BC28  
DA09 DA23 DA27

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-115826

(P2006-115826A)

(43) 公開日 平成18年5月11日(2006.5.11)

(51) Int. Cl.

C12N 5/06 (2006.01)

F1

C12N 5/00

E

テーマコード (参考)

4B065

審査請求 未請求 請求項の数 10 書面 (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願2004-338152 (P2004-338152)  
(22) 出願日 平成16年10月25日 (2004.10.25)

(71) 出願人 504430569  
小林 泰信  
東京都新宿区余丁町14-4 「ジェー・  
ビー・セラピューティクス株式会社内」

(71) 出願人 504430868  
谷川 啓司  
東京都新宿区余丁町14-4 「ジェー・  
ビー・セラピューティクス株式会社内」

(71) 出願人 504430880  
有賀 淳  
東京都新宿区余丁町14-4 「ジェー・  
ビー・セラピューティクス株式会社内」

(72) 発明者 小林 泰信  
東京都新宿区余丁町14-4

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ナチュラルキラー細胞の増殖促進方法およびそれに用いる培養組成物

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、従来のLAK細胞の培養方法に比較して、ナチュラルキラー細胞の増殖が促進される培養方法を提供することを目的とする。

【解決手段】 本発明に係るナチュラルキラー細胞の増殖を促進する方法は、ナチュラルキラー細胞を含む細胞群を、CD56分子のリガンドを含む培地中で培養する工程を特徴とするものである。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

ナチュラルキラー細胞の増殖を促進させる方法であって、  
ナチュラルキラー細胞を含む細胞群を、CD56分子のリガンドを含む培地中で培養する工程を含む、方法。

## 【請求項2】

前記細胞群が、血液から得た単核球細胞またはリンパ球分画である、請求項1に記載の方法。

## 【請求項3】

前記培地が、さらにインターロイキン2を含む、請求項1または2に記載の方法。

## 【請求項4】

前記CD56分子のリガンドが、グリコサミノグリカンである、請求項1から3のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項5】

前記CD56分子のリガンドが、グリコサミノグリカンを構成成分とするプロテオグリカンである、請求項1から3のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項6】

前記CD56分子のリガンドが、グリコサミノグリカンを構成成分とするプロテオグリカンを発現する細胞である、請求項1から3のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項7】

前記グリコサミノグリカンを構成成分とするプロテオグリカンを発現する細胞が、ヘパリチナーゼ処理またはコンドロイチナーゼ処理によって、そのナチュラルキラー細胞の増殖促進能が低下する細胞である、請求項6に記載の方法。

## 【請求項8】

前記グリコサミノグリカンが、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸、デルマトン硫酸からなる群より選択される一以上の物質である、請求項4から7のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項9】

以下(a)～(c)の少なくとも一つを含むナチュラルキラー細胞の増殖を促進させる培養組成物：

(a) グリコサミノグリカン。

(b) グリコサミノグリカンを構成成分とするプロテオグリカン。

(c) グリコサミノグリカンを構成成分とするプロテオグリカンを発現する細胞。

## 【請求項10】

前記グリコサミノグリカンが、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸、デルマトン硫酸からなる群より選択される一以上の物質である、請求項9に記載の培養組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

この発明は、ヒト白血球中に存在するナチュラルキラー細胞（以下、NK細胞と略す場合もある）を生体外で培養する際、その増殖を促進させる方法に関するものである。

## 【背景技術】

## 【0002】

近年になって、生体の細胞性免疫機能を応用した細胞免疫療法が癌をはじめとする様々な疾患の治療や予防に適用されるようになってきた。特に癌治療の分野では、ここ数十年にわたり世界中で多くの臨床試験が実施され、今日では外科的療法、化学療法、放射線療法に次ぐ第4の治療法として認知されるようになってきている。

## 【0003】

癌を対象とした治療法を例にとると、細胞免疫療法は主に以下の3つの治療法に分類される。すなわちインターロイキン-2（以下IL-2と略す）などのサイトカインによっ

て活性化されたリンパ球を治療に用いる「LAK療法」(例えば、非特許文献1参照)、抗原特異的な細胞傷害性活性を有するキラーT細胞治療に用いる「活性化リンパ球移入療法」(例えば、非特許文献2参照)、そして癌抗原に特異的な免疫反応を誘導する能力を持つ樹状細胞を応用した「樹状細胞ワクチン療法」(例えば、非特許文献3参照)である。

#### 【0004】

このうち「LAK療法」は、体外に取り出したリンパ球分画をIL-2存在下で培養することにより、ナチュラルキラー細胞をはじめとするリンパ球の癌細胞に対する殺傷能力が顕著に高まる現象を利用する療法である。すなわち、LAK療法とは、末梢血から単核球分画(リンパ球+単球)もしくは単核球分画より単球を取り除いたリンパ球分画を調製し、その分画をIL-2を含有する培地で1~2週間培養して抗腫瘍活性を強化させた後、この細胞を生体内に戻す療法であり、1980年代にRosenbergらにより癌患者を対象とした臨床研究が開始されたのを端緒とし、現在でも世界中で広く実施されている(例えば、非特許文献4参照)。このように、IL-2存在下で培養され、癌細胞に対する殺傷能力が高まるように誘導された細胞をLAK細胞と呼ぶ。

【非特許文献1】Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Leitman S, Chang AE, Ettinghausen SE, Matory YL, Skibber JM, Shiloni E, Vetto JT., N Engl J Med. 1985 Dec 5; 313(23): 1485-92.

【非特許文献2】Takayama T, Sekine T, Makuuchi M, Yamasaki S, Kosuge T, Yamamoto J, Shimada K, Sakamoto M, Hirohashi S, Ohashi Y, Kakizoe T., Lancet. 2000 Sep 2; 356(9232): 802-7.

【非特許文献3】Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D., Nat Med. 1998 Mar; 4(3): 328-32.

【非特許文献4】Rosenberg SA., Semin Oncol. 1986 Jun; 13(2): 200-6.

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0005】

しかしながら、上述した培養方法では、LAK細胞の効果の主体となるナチュラルキラー細胞が常に効率よく増殖するとは限らないことが知られている。

#### 【0006】

特に癌患者ではナチュラルキラー細胞の培養が困難な症例がしばしば認められる。すなわち上記の一般的な培養方法で培養しても、ナチュラルキラー細胞の増殖がほとんど認められず、他の細胞、例えばCD56陽性、CD3陽性のT細胞の増殖が優勢となり、結果的にナチュラルキラー細胞をほとんど含まないLAK細胞が誘導されることになる。

#### 【0007】

我々が、主に消化器癌の患者を対象として、常法にしたがってこれらの患者の末梢血リンパ球分画よりLAK細胞を誘導した結果、20例中11例では、健常人同様にナチュラルキラー細胞の増殖が旺盛なLAK細胞(ナチュラルキラー細胞の比率: 平均20.4%)を誘導することができたが、20例中9例では、CD56陽性、CD3陽性のT細胞が優位となり、ナチュラルキラー細胞の増殖はほとんど認められなかった(ナチュラルキラー細胞の比率: 平均2.2%)。このようなCD56陽性CD3陽性T細胞優位なLAK細胞は、ナチュラルキラー細胞優位なLAK細胞と比べて、癌細胞に対する傷害活性およびインターフェロン $\gamma$ やTNF $\alpha$ などのサイトカイン産生能が著しく低い。したがってこのようなナチュラルキラー細胞の増殖がほとんど認められなかったLAK細胞を用いてもほとんど治療の効果が期待できない。

#### 【0008】

そこで、上述のようなナチュラルキラー細胞の増殖が困難な患者、つまり例えば常法通り培養しても抗腫瘍活性の低いCD56陽性CD3陽性T細胞が優位となるような患者においてもLAK療法の恩恵を享受することが可能となるような新たな細胞培養法、すなわち抗腫瘍活性の強いナチュラルキラー細胞を良好に増殖させることを可能とする新たなLAK細胞の培養方法の開発が待ち望まれている。さらに従来までの方法でナチュラルキラー細胞の増殖が良好な患者の場合でも、その増殖をさらに促進することで、LAK療法の効果もさらに高まることが期待される。

【0009】

一方、近年、リツキサンやハーセプチン等の腫瘍抗原特異的なモノクローナル抗体を主成分とする抗体医薬品が開発され治療に用いられているが、これらの医薬品の抗腫瘍作用の機序の一つがナチュラルキラー細胞による抗体依存性細胞傷害活性である事も明らかとなっている(Carson WE 他, Eur J Immunol. 2001 Oct; 31(10): 3016-25. およびMaloney DG 他, Semin Oncol. 2002 Feb; 29(1 Suppl 2): 2-9. )。したがって、より多くのナチュラルキラー細胞の増殖が可能となれば、LAK療法の有効性が高まることが期待されるのみでなく、上記のような抗体医薬品とLAK療法を併用することによって、その効果が相乗的に高まることが期待され、結果的に、さまざまな様相を呈する癌に対して、より有用な治療法を提供することが可能となると考えられる。

【0010】

そこで、本発明は、従来のLAK細胞の培養方法に比較して、ナチュラルキラー細胞の増殖が促進される培養方法、およびその培養方法に適する培養組成物を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

かかる問題を解決するために鋭意検討した結果、発明者らは、ナチュラルキラー細胞を含む細胞群を、ナチュラルキラー細胞が発現するCD56分子のリガンドを含む培地中で培養することによって、ナチュラルキラー細胞の増殖を選択的に促進させる事が可能であることを見出した。

【0012】

CD56分子は接着分子の一つである神経細胞接着分子(NCAM)のアイソフォームの一つであり、末梢血中では、ナチュラルキラー細胞や一部のT細胞のサブセットに発現することが知られていたが、これまでに、そのリガンドを加えることで、これらの細胞の増殖が促進されることはまったく知られていなかった。本発明に係る方法によれば、IL-2のみによる誘導ではナチュラルキラー細胞の増殖がほとんど認められず、CD56陽性CD3陽性T細胞等が優位となるような細胞群においても、ナチュラルキラー細胞の増殖が十分に促進される。また、もともとナチュラルキラー細胞の増殖が良好な細胞群の場合も、より多くのナチュラルキラー細胞を含有する細胞群を誘導することができる。

【0013】

ナチュラルキラー細胞を含む細胞群としては、例えば血液から得た単核球細胞やリンパ球分画が挙げられ、これらの細胞群は当業者であれば公知の方法に従って容易に調製することが可能である。

発明の一態様として、本発明は、ナチュラルキラー細胞を含む細胞群を培養する際に、CD56分子のリガンドの一つであるグリコサミノグリカン類を培地に添加することでナチュラルキラー細胞の増殖を顕著に促進する培養方法を提供するものである。

【0014】

発明に用いるグリコサミノグリカンとしては、例えば、ヘパリン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸などを用いることができる。これらは、いずれも硫酸基を持つ糖が規則正しく配列した多糖類であり、また、いずれもCD56分子に結合するリガンドとしての機能を有している。

【0014】

これらのグリコサミノグリカンは、一部の医薬品グレードのものを含め、試薬として容易に入手することが可能である。これらは主に動物の皮膚や軟骨などから精製されたものであるが、その由来は特定されるものではない。また上記のような天然由来のもののみならず、各々のグリコサミノグリカンの構成糖を用いて化学的に合成された人工的なグリコサミノグリカンを用いることも可能である。

【0015】

培養時に添加するグリコサミノグリカンの濃度は、特に限定されるものではないが、低濃度であれば十分な効果が期待できず、また濃度が高すぎても逆に細胞の生育に好ましくない作用を及ぼす可能性もあるため、例えばヘパリンの場合には最終濃度で0.1ユニット/mL～1000ユニット/mLの範囲で、好ましくは0.5ユニット/mL～500ユニット/mL、最も好ましくは1ユニット/mL～100ユニット/mLとする。またコンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸、デルマトン硫酸の場合は、最終濃度で0.1～1000 $\mu$ g/mLの範囲で、好ましくは0.5 $\mu$ g/mL～500 $\mu$ g/mL、最も好ましくは1 $\mu$ g/mL～300 $\mu$ g/mLの範囲とする。

【0016】

またこれらのグリコサミノグリカンは一種類のみ用いても、また二種以上の混合物として用いてもかまわない。

【0017】

さらにCD56分子のリガンドとしては、多糖体であるグリコサミノグリカンそのもののみならず、グリコサミノグリカンがコア蛋白質に結合した形態、すなわちグリコサミノグリカンを糖鎖の構成成分とするプロテオグリカンを用いることも可能である。

【0018】

発明の別の態様として、本発明は、細胞群を培養する際に、白血球単核球分画もしくはリンパ球分画を、細胞表面にヘパリン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸やデルマトン硫酸などを構成成分とするプロテオグリカンを発現する別の細胞と共培養することで、ナチュラルキラー細胞の増殖を顕著に促進する培養方法を提供するものである。

【0019】

共培養に用いることができる細胞は、各グリコサミノグリカン類に対する抗体を用いて常法によりフローサイトメーターや免疫染色により検索することが可能である。また、ヘパリチナーゼ、コンドロイチナーゼ等の酵素で細胞表面グリコサミノグリカンを分解処理することでナチュラルキラー細胞の増殖促進作用が消失または減弱するような細胞も共培養に用いることができる。このような条件を満たす細胞としては、肝臓癌細胞株のHuH2（下記に具体例を示す）、骨髄性白血病細胞株であるK562、乳癌細胞株のMCF7、また胆嚢癌細胞株であるAGなどが挙げられるが、本発明に用いることのできる細胞はこれらの細胞株に限定されるものではない。

【0020】

共培養に用いる細胞株とリンパ球との混合の比率は特定されないが、好ましくは1:1から1:100の範囲で、さらに好ましくは1:5から1:20の範囲で混合して培養することができる。

【0021】

また共培養に用いる細胞株自体が培養時に増殖するような好ましくない事態を防ぐために、事前にその分裂増殖能を抑制する処置を施すことが好ましい。この処置は、細胞株を共培養に用いる前に、マイトマイシンCとともに培養したり、あるいは放射線を照射する等、当業者が一般的に用いる手法によって行う事ができる。

【0022】

さらに、本発明は、本発明を実施するための培養組成物をも提供する。

【0023】

この培養組成物は、リンパ球を培養するのに一般に用いられる培地を基本組成とし、そこにナチュラルキラー細胞の増殖を促す添加物としてグリコサミノグリカン、グリコサミノグリカンを構成成分とするプロテオグリカン、および/またはグリコサミノグリカンを

構成成分とするプロテオグリカンを発現する細胞を添加したものとして提供される。

【0024】

リンパ球を培養するのに用いられる標準的な培地には、RPMI-1640培地、AIM-V培地、X-VIVO培地などがある。よって基本組成となる基礎培地はこれらの標準的な培地をそのまま用いることもできるが、これらの培地に限定されるものでもなく、リンパ球培養が可能である培地であればどのような培地組成であってもかまわない。そして当該発明の培養組成物は、このような基本組成に、グリコサミノグリカンとして、ヘパリン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸などを添加することで構成される。グリコサミノグリカンは、最終濃度でヘパリンでは0.1ユニット/mL~1000ユニット/mL、好ましくは0.5ユニット/mL~500ユニット/mL、最も好ましくは1ユニット/mL~100ユニット/mLの濃度範囲で、またコンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸、デルマタン硫酸では0.1 $\mu$ g/mL~1000 $\mu$ g/mL、好ましくは0.5 $\mu$ g/mL~500 $\mu$ g/mL、最も好ましくは1 $\mu$ g/mL~300 $\mu$ g/mLの濃度範囲で配合された形で提供される。

【発明の効果】

【0025】

本発明に係る方法によれば、ナチュラルキラー細胞を含む細胞群を、CD56分子のリガンドを含む培地で培養することにより、ナチュラルキラー細胞の増殖を選択的に促進することができる。本方法によれば、IL-2によってナチュラルキラー細胞の増殖が誘導されなかった細胞群においても、効率よくナチュラルキラー細胞を増殖させることが可能となると共に、もともとIL-2によってナチュラルキラー細胞の増殖が誘導されやすい細胞群においても、より多くのナチュラルキラー細胞を含む培養物を得ることができる。このようにして得られたナチュラルキラー細胞を高い比率で含む細胞組成物を用いれば、LAK療法の効果も高められ、また、リツキサンやハーセプチン等の抗体医薬品とLAK療法の併用により、有用な治療法を提供することも可能となると考えられる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0026】

以下に具体的な例を記載して発明の効果を説明する。

【実施例】

健康人由来サンプルにおける、ヘパラン硫酸およびコンドロイチン硫酸A、デルマタン硫酸によるナチュラルキラー細胞(=NK細胞)の増殖の促進。

【0027】

健康人の末梢血30mLより、常法に従ってリンフォセパール(免疫生物研究所社製)を用いて60,000,000個の末梢血単核球細胞を得た。その後この細胞をAIM-V培地(インビトロジェン社製)に懸濁させて150cm<sup>2</sup>の培養用フラスコに播種した後に37℃のCO<sub>2</sub>インキュベーターで60分間培養し、その後浮遊している細胞を回収し、33,000,000個のリンパ球分画を得た。このリンパ球分画を、牛胎児血清10%、IL-2(1,000国際単位/mL)を含むAIM-V培地に懸濁し、24ウェルの培養プレートに1,000,000個/1mL/ウェルとなるように播種した。またヘパラン硫酸(生化学工業(株)製)、コンドロイチン硫酸A(生化学工業製)あるいはデルマタン硫酸を最終濃度で100 $\mu$ g/mLとなるように培地に加えた。その後37℃のCO<sub>2</sub>インキュベーターで培養し、培養7日目に各ウェルに牛胎児血清10%、IL-2(1,000国際単位/mL)を含むAIM-V培地を1mL加えて細胞を懸濁した後にその細胞懸濁液を2ウェルに播きかえ、また培養11日目に同様の方法で2ウェルを4ウェルに播きかえて培養した。そして培養14日目に、細胞を回収して血球計算盤を用いて細胞数を計測するとともに、フローサイトメーターを用いてNK細胞(CD3陰性、CD56陽性、CD16陽性)の比率を計測し、NK細胞数を算出した。

【0028】

その結果を表1に示した。培養開始前の時点、すなわち末梢血リンパ球分画中に8.5%であったNK細胞が、培地中に最終濃度で100 $\mu$ g/mLのヘパラン硫酸、コンドロ

イチン硫酸Aあるいはデルマトン硫酸を加えて2週間培養することで、各々48.2%、24.2%、49.2%となり、またNK細胞数も培養開始時の各々72.5倍、23.5倍、112.7倍となった。

一方、比較例として、グリコサミノグリカンを加えない条件で2週間培養した場合は、NK細胞の比率は17.0%までしか増加せず、細胞数も16.5倍に留まった。

表1 ヘパリン硫酸、コンドロイチン硫酸A、デルマトン硫酸による健常人NK細胞の増殖。

	培養前	培養14日目			
		対照	ヘパリン硫酸 100 $\mu$ g/mL	コンドロイチン硫酸 A 100 $\mu$ g/mL	デルマトン硫酸 100 $\mu$ g/mL
NK細胞の比率 (%)	8.5	17.0	48.2	24.2	49.2
NK細胞増殖率 (倍)	—	16.5	72.5	23.5	112.7

【実施例】

【0029】

健常人由来サンプルにおけるヘパリンによるNK細胞の増殖の促進。

【0030】

健常人の末梢血20mLより、常法に従ってリンフォセパルを用いて血単核球細胞を調製し、その後この細胞をAIM-V培地に懸濁して75cm<sup>2</sup>の培養用フラスコに播種した後に37℃のCO<sub>2</sub>インキュベーターで60分間培養し、その後浮遊している細胞を回収し、13,000,000個のリンパ球分画を得た。このリンパ球分画を、牛胎児血清10%、IL-2(1,000国際単位/mL)を含むAIM-V培地に懸濁し、24ウェルの培養プレートに1,000,000個/mL/ウェルとなるように播種した。またヘパリン(持田製薬製)を最終濃度で5ユニット/mLとなるように加えた。その後37℃のCO<sub>2</sub>インキュベーターで培養し、培養7日目に各ウェルに牛胎児血清10%、IL-2(1,000国際単位/mL)を含むAIM-V培地を1mL加えて細胞を懸濁した後にその細胞懸濁液を2ウェルに播きかえ、また培養11日目に同様の方法で2ウェルを4ウェルに播きかえて培養した。そして培養14日目に、細胞を回収して血球計算盤を用いて細胞数を計測するとともに、フローサイトメーターを用いてNK細胞(CD3陰性、CD56陽性、CD16陽性)の比率を計測し、NK細胞数を算出した。

【0031】

その結果を表2に示した。培養開始前の時点、すなわち末梢血リンパ球分画中に4.1%であったNK細胞が、培地中に最終濃度で5ユニット/mLのヘパリンを加えて2週間培養することで、11.6%となり、NK細胞数も培養開始時の21.6倍となった。

一方、比較例として、ヘパリンを加えない条件で2週間培養したところ、NK細胞の比率は5.5%までしか増加せず、細胞数も10.2倍に留まった。

表2 ヘパリンによる健康人NK細胞の増殖

	培養前	培養14日目	
		対照	ヘパリン 5ユニット/mL
NK細胞の比率 (%)	4.1	5.5	11.6
NK細胞の増殖率 (倍)	—	10.2	21.6

## 【実施例】

【0032】

担癌患者由来サンプルにおけるヘパリンによるNK細胞の選択的な増殖の促進。

【0033】

肝臓癌の患者末梢血より調製したリンパ球分画を、24ウェルの培養プレートに、牛胎児血清10%、IL-2(1,000国際単位/mL)を含むAIM-V培地に懸濁し、1,000,000個/mL/ウェルとなるように播種した。またヘパリン(持田製薬(株)製)を最終濃度で5ユニット/mL(5単位/mL)となるように加えた。その後37℃のCO<sub>2</sub>インキュベーターで培養し、培養7日目に各ウェルに牛胎児血清10%、IL-2(1,000国際単位/mL)を含むAIM-V培地を1mL加えて細胞を懸濁した後にその細胞懸濁液を2ウェルに播きかえ、また培養11日目に同様の方法で2ウェルを4ウェルに播きかえて培養した。そして培養14日目に、細胞を回収して血球計算盤を用いて細胞数を計測するとともに、フローサイトメーターを用いてNK細胞(CD3陰性、CD56陽性、CD16陽性)ならびにCD56陽性T細胞(CD3陽性、CD56陽性、CD16陰性)の比率を計測し、各々の細胞数を算出した。

【0034】

その結果を表3に示した。培養開始前の時点、すなわち末梢血リンパ球分画中に5.0%であったNK細胞が、培地中に最終濃度で5ユニット/mLのヘパリンを加えて2週間培養することで、27.9%となり、またNK細胞数も培養開始時の30.0倍となった。

比較例として、ヘパリンを加えない条件で2週間培養したところ、NK細胞の比率は16.5%までしか増加せず、細胞数も16.6倍に留まった。

一方、CD56陽性T細胞は、末梢血リンパ球分画中に11.0%であり、ヘパリンを加えて培養した場合は32.5%(細胞数15.7倍)となり、ヘパリンを加えずに培養した場合は約44.7%(細胞数20.5倍)であった。

以上の結果から、ヘパリンはNK細胞の増殖を促進する作用を有するが、CD56陽性T細胞の増殖には逆に抑制的に機能する作用を有することが明らかとなった。

表3 ヘパリンによる担癌患者NK細胞およびCD56陽性T細胞の増殖

	培養前	培養 14 日目	
		対照	ヘパリン 5 ユニット/mL
NK 細胞の比率 (%)	5.0	16.5	27.9
NK 細胞の増殖率 (倍)	—	16.6	30.0
CD56 陽性 T 細胞の 比率 (%)	11.0	44.7	32.5
CD56 陽性 T 細胞の 増殖率 (倍)	—	29.6	15.7

## 【実施例】

## 【0035】

IL-2によりCD56陽性T細胞が優位となる担癌患者由来サンプルにおける、コンドロイチン硫酸Aおよびデルマトン硫酸によるNK細胞の選択的な増殖の促進。

## 【0036】

胃癌患者の末梢血より調製したリンパ球分画を、24ウェルの培養プレートに、牛胎児血清10%、IL-2(1,000国際単位/mL)を含むAIM-V培地に懸濁し、1,000,000個/mL/ウェルとなるように播種した。またコンドロイチン硫酸Aあるいはデルマトン硫酸を最終濃度で100 $\mu$ g/mLとなるように培地に加えた。その後37℃のCO<sub>2</sub>インキュベーターで培養し、培養7日目に各ウェルに牛胎児血清10%、IL-2(1,000国際単位/mL)を含むAIM-V培地を1mL加えて細胞を懸濁した後にその細胞懸濁液を2ウェルに播きかえ、また培養11日目に同様の方法で2ウェルを4ウェルに播きかえて培養した。そして培養14日目に、細胞を回収して血球計算盤を用いて細胞数を計測するとともに、フローサイトメーターを用いてNK細胞(CD3陰性、CD56陽性、CD16陽性)の比率ならびにCD3陽性、CD56陽性細胞の比率を計測し、NK細胞数およびCD56陽性T細胞数を算出した。

## 【0037】

その結果を表4に示した。培養開始前の時点、すなわち末梢血リンパ球分画中に1.3%であったNK細胞は、グリコサミノグリカンを加えない条件で2週間培養したところ、細胞数は4.5倍に増加したものの、その比率は0.5%に低下した。しかしながら培地中に最終濃度で100 $\mu$ g/mLのコンドロイチン硫酸Aもしくはデルマトン硫酸を加えて2週間培養すると、NK細胞の比率は各々2.4%、2.3%となり、またNK細胞数も各々培養開始時の26.1倍および26.3倍となり、NK細胞の増殖が顕著に促進されることが明らかとなった。

一方、末梢血リンパ球分画中に1.2%であったCD56陽性T細胞数は、グリコサミノグリカンを加えない条件で2週間培養することで、細胞数は420.8倍に増加し、その比率は約42.2%となった。一方、100 $\mu$ g/mLのコンドロイチン硫酸Aもしくはデルマトン硫酸存在下で2週間培養した場合も、CD56陽性T細胞の比率は各々36.9%および39.8%となり、また細胞数も各々培養開始時の458.3倍および521.8倍であり、CD56陽性T細胞数の増殖はグリコサミノグリカンを加えない場合とほぼ同程度であった。

以上の結果から、コンドロイチン硫酸Aもしくはデルマトン硫酸の添加によってNK細胞の増殖が選択的に促進されることが確認された。



表4 コンドロイチン硫酸A、デルマタン硫酸による担癌患者NK細胞およびCD56陽性T細胞の増殖。

	培養前	培養14日目		
		対照	コンドロイチン硫酸A 100 $\mu$ g/ml	デルマタン硫酸 100 $\mu$ g/ml
NK細胞の比率(%)	1.3	0.5	2.4	2.3
NK細胞の増殖率(倍)	—	4.5	26.1	26.3
CD56陽性T細胞の比率(%)	1.2	42.2	36.9	39.8
CD56陽性T細胞の増殖率(倍)	—	420.8	458.3	521.8

【実施例】

【0038】

健常人由来サンプルにおけるグリコサミノグリカン発現細胞との共培養によるNK細胞の選択的な増殖の促進。

【0039】

健常人の末梢血より調製したリンパ球分画を、24ウェルの培養プレートに、牛胎児血清10%、IL-2(1,000国際単位/mL)を含むAIM-V培地に懸濁し、2,000,000個/2mL/ウェルとなるように播種した。また、予め最終濃度で50 $\mu$ g/mLのマイトマイシンC存在下で30分培養してその分裂増殖能を停止させたHuH2細胞株(肝臓癌細胞株)を、200,000個/2mL/ウェルとなるように播種した(リンパ球分画細胞数:HuH2細胞数=10:1)。また一部のHuH2細胞は、事前にリン酸緩衝生理食塩水中にて最終濃度で10mU/mLのヘパリチナーゼI(生化学工業製)、で37℃、4時間酵素処理を行うことで細胞表面のグリコサミノグリカンを消化し、酵素処理を行わなかった細胞を用いた場合と比較した。

【0040】

その結果を表5に示した。培養開始前の時点、すなわち末梢血リンパ球分画中に6.8%であったNK細胞は、IL-2存在下で7日間培養したところ、NK細胞の比率は10.4%、細胞数は1.9倍に増加したが、HuH2細胞と共培養することでNK細胞の比率は14.5%、細胞数は培養開始時の3.7倍となり、NK細胞の増殖が顕著に促進されることが明らかとなった。一方、事前にヘパリチナーゼIで前処理を行なったHuH2細胞と共培養すると、NK細胞の比率は11.9%となり、またNK細胞数も培養開始時の2.5倍となり、ヘパリチナーゼIで細胞表面のグリコサミノグリカンを消化したHuH2細胞では、無処置のHuH2細胞と比較してNK細胞の増殖を促進する作用の顕著な低下が認められた。

以上の結果から、HuH2細胞との共培養によりNK細胞の増殖が選択的に促進されることが、そしてそのNK細胞の増殖促進作用がHuH2細胞の発現するグリコサミノグリカンを介した作用であることが確認された。

表 5 H u H 2 細胞との共培養による健常人 N K 細胞の増殖とグリコサミノグリカン分解酵素処理の影響

	培養前	培養 7 日 目		
		対 照	HuH2 細胞との共培養	
			無処理	α <sub>1</sub> -リクターゼ I 処理
NK 細胞の比率(%)	6.8	10.4	14.5	11.9
NK 細胞増殖率(倍)	—	1.9	3.7	2.5

【発明の産業上の利用分野】

【0041】

本発明は、ヒト白血球中に存在するナチュラルキラー細胞を生体外で培養して増殖させる方法に関するものである。本発明に記載された方法で培養されたナチュラルキラー細胞は、癌やウイルス性疾患等の治療および／または予防のための細胞免疫療法に用いることができる。

(72)発明者 谷川 啓司

東京都新宿区余丁町 1 4 - 4

(72)発明者 有賀 淳

東京都新宿区余丁町 1 4 - 4

F ターム(参考) 4B065 AA94 AC20 BB18 BB19 BB34 BC01 BC11 BD38 BD39 BD42  
CA44